



Agilent 6120 シングル四重極 LC/MS による だし入り醤油中核酸塩基類の一斉分析



＜要旨＞ Agilent 6120 シングル四重極型 LC/MS を用いて、核酸塩基類 15 種類を一斉に分析可能な手法を開発しました。本手法は食品中の核酸塩基類を、一般的な逆相条件と同じ移動相条件を用いて簡便且つ迅速に定量分析することが可能です。

Key Words: LC/MS、SIM、核酸塩基、食品、呈味成分、親水性成分

* * * * *

1. はじめに

特定保健用食品（トクホ）、栄養機能食品に続いて第三の保健機能食品として、2015 年 4 月に機能性表示食品制度が施行されました。機能性表示食品は 2016 年 3 月現在で 241 件の届出書が受理されており、今後も増え続けることが予想されます。事業者は有効成分の分析データ等の科学的根拠を示す必要があるため、機能性成分の分析需要は高まっています。効率的な商品開発のために、できるだけ多くの機能性成分を簡便且つ迅速に分析する手法が必要とされています。

そこで、本稿では食品の機能性に関わる成分として、核酸塩基類について簡便且つ迅速に一斉分析できる条件を Agilent 6120 シングル四重極 LC/MS を用いて検討しました。また、開発した分析手法をだし入り醤油へ適用したので紹介します。

2. 実験方法

核酸塩基類は各標準試料を超純水及び 10 mM アンモニア水で溶解しました。各標準品溶液を用いて核酸塩基 15 種類の混合溶液を調製して LC/MS に供しました。また、検量線の作成のため、適宜超純水を用いて希釈いたしました。

だし入り醤油サンプルは超純水で 100 倍希釈し分画分子量 3000 の限外ろ過フィルターによりろ過したものを LC/MS に供しました。

機器条件

ソフトウェア : OpenLAB ChemStation Edition

Liquid Chromatography :

装置 : Agilent 1260 Binary pump

カラム : Discovery HS-F5 (2.1 x 250mm, 5 μ m, Sigma-Aldrich)

移動相 : A: 0.1% ギ酸水溶液
B: アセトニトリル

流速 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 3 μ l

グラジエント	: 時間 (分)	%B
	0	0
	5	0
	15	60

ポストタイム : 10 分

Mass Spectrometry

装置 : Agilent 6120 シングル四重極 LC/MS システム

イオン源 : Electro Spray Ionization

極性 : ポジティブモード

乾燥ガス : N₂ (350 $^{\circ}$ C at 10 L/min)

ネブライザーガス : N₂ (30 psi)

キャピラリー電圧 : 3000 V



Table 1 核酸のSIM条件

核酸	m/z	フラグメンター 電圧 / V
アデニン	136	120
アデノシン	268	100
アデノシン-5'-リン酸 (5'-AMP)	348	120
グアニン	152	140
グアノシン	284	140
グアノシン-5'-リン酸 (5'-GMP)	364	120
シトシン	112	110
シチジン	244	70
シチジン-5'-リン酸 (5'-CMP)	324	70
ウラシル	113	100
ウリジン	245	60
ウリジン-5'-リン酸 (5'-UMP)	325	70
ヒポキサンチン	137	120
イノシン	269	60
イノシン 5'-リン酸 (5'-IMP)	349	70

3. 結果及び考察

Fig. 1に標準試料混合溶液 500 ng/ml 中核酸塩基 15 種類の SIM クロマトグラムを示しました。アデニンとヒポキサンチン、シトシンとウラシル関連核酸塩基はそれぞれ質量が 1 Da 違いのため、ヒポキサンチンの SIM クロマトグラムにはアデニンの同位体イオンが検出されますが、溶出時間が異なるため識別できます。シトシンとウラシル関連核酸塩基類に関してましても保持時間が異なるため識別が可能です。また、核酸類は In-source CID によりフラグメントを生じやすい傾向がありました。例えば、ウリジンは In-source CID によってウラシルのフラグメントイオンを生じるため、 m/z 113 をモニタリングすると、ウリジンと同じ保持時間にピークが観測されます。しかし、これらは全て保持時間が異なるため、識別が可能でした。また本分析条件において、同じ塩基由来の核酸について保持時間を比較すると、リボヌクレオチド、塩基、ヌクレオシドの順番に溶出しました。

Table 2に各核酸塩基類の検量線を示しました。検討した濃度範囲で良好な直線性を示しました。塩基とヌクレオシドはリボヌクレオチドに比べて約 10 倍の感度を示しました。

Fig. 2にだし入り醤油中の核酸塩基 15 種類の SIM クロマトグラムを示しました。核酸塩基全てを検出できました。

4. まとめ

LC/MS により、核酸塩基類の一斉分析条件を検討しました。食品中の核酸塩基 15 種類を簡便且つ迅速に分析することが可能な分析手法を開発しました。

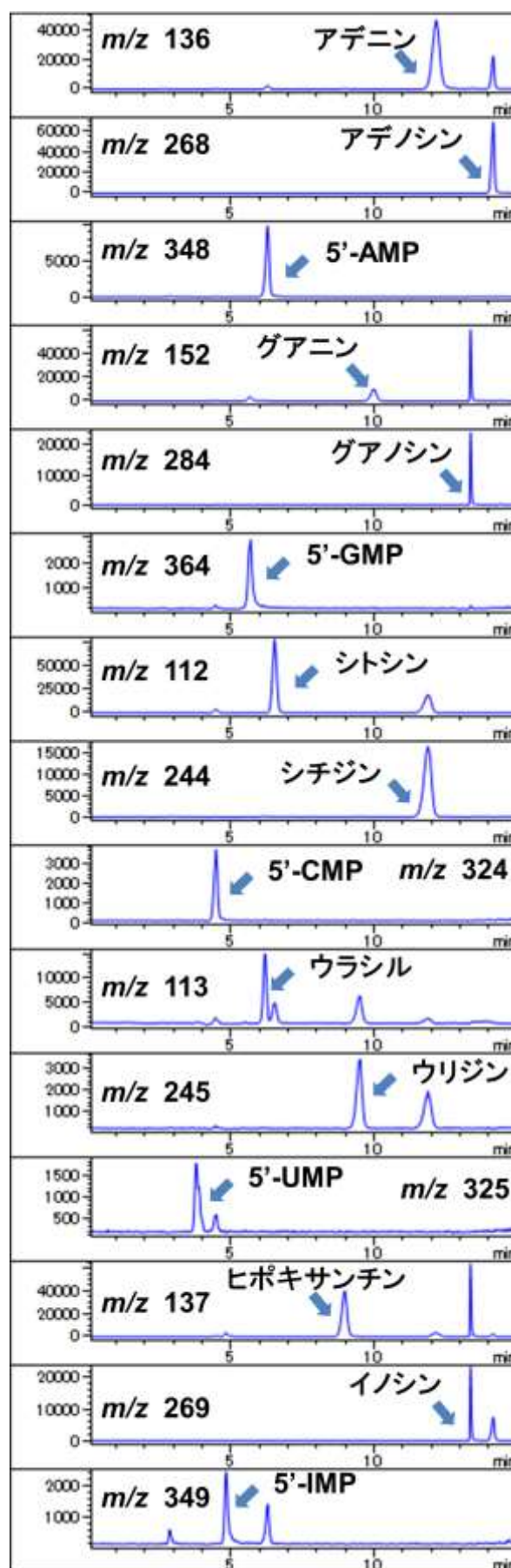


Fig.1 核酸標準試料の SIM クロマトグラム
濃度: 500 ng/ml, ESI-Positive



Table 2 核酸塩基類の検量線

成分	直線範囲 / ppb	相関係数
アデニン	1-100	0.999
アデノシン	1-50	0.998
5'-AMP	10-5000	0.999
グアニン	1-1000	0.999
グアノシン	1-500	0.999
5'-GMP	50-10000	0.999
シトシン	1-1000	0.997
シチジン	1-100	0.999
5'-CMP	50-10000	0.999
ウラシル	10-1000	0.998
ウリジン	50-1000	0.999
5'-UMP	50-5000	0.999
ヒポキサンチン	5-1000	0.999
イノシン	1-100	0.994
5'-IMP	50-1000	0.999

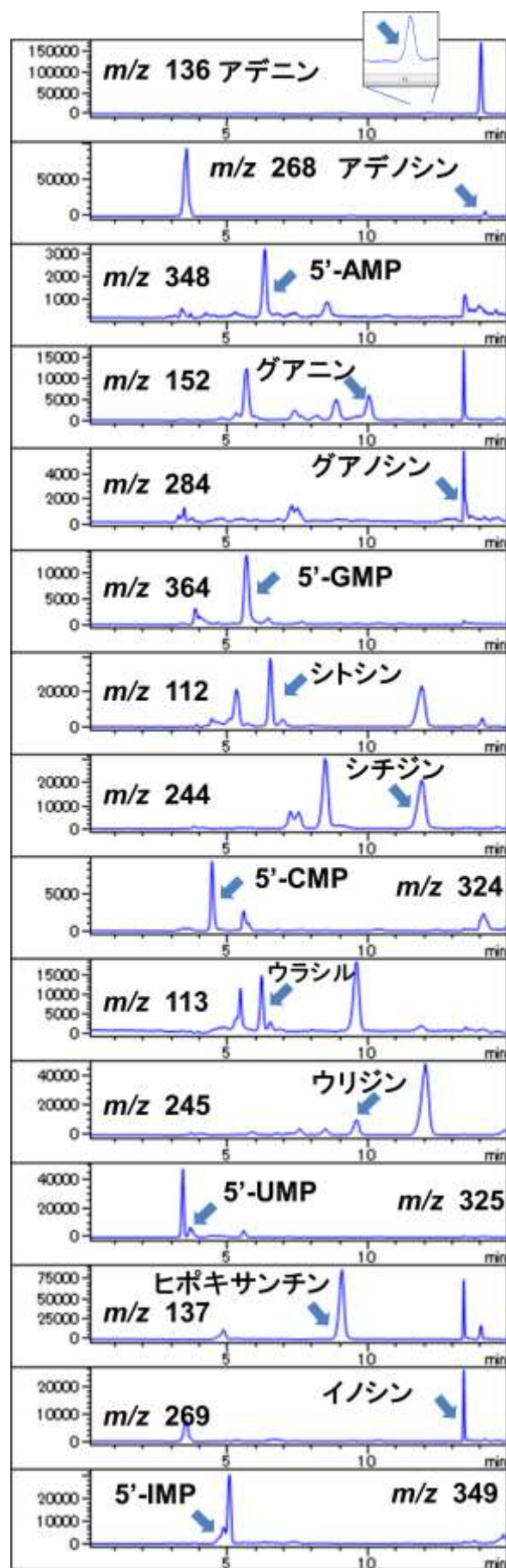


Fig.2 だし入り醤油中核酸のSIMクロマトグラム

【LC-MS-201607YM-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。
また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies